

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-289506

(P2008-289506A)

(43) 公開日 平成20年12月4日(2008.12.4)

(51) Int.Cl.
C12N 1/02 (2006.01)F1
C12N 1/02テーマコード (参考)
4B065

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2008-232682 (P2008-232682)	(71) 出願人	502032437
(22) 出願日	平成20年9月10日 (2008. 9. 10)		バイオイー, インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2002-581061 (P2002-581061) の分割		アメリカ合衆国 ミネソタ 55127, セント ポール, センタービル ロー ド 4280
原出願日	平成14年3月7日 (2002.3.7)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/282, 823		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成13年4月10日 (2001. 4. 10)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	ダニエル ピー. コリンズ
			アメリカ合衆国 ミネソタ 55014, リノ レイクス, ペリカン プレイス 6656
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞分離組成物および方法

(57) 【要約】

【課題】組織培養、免疫表現系決定、他の診断試験、さらなる精製、および治療的投与のための細胞を効率的に調製するために用いられ得る、細胞を分離するための組成物および方法を提供すること。

【解決手段】 a) デキストラン; b) 抗グリコホリン A 抗体; c) 抗 CD 15 抗体; d) 抗 CD 9 抗体; ならびに e) 抗 CD 3 抗体、抗 CD 72 抗体、抗 CD 16 抗体、抗 CD 4 抗体、抗 CD 8 抗体、および抗 CD 2 抗体からなる群より選択される抗体、を含む、組成物。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

本明細書に記載されるような、組成物および方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(技術分野)

本発明は、細胞を分離するための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

(背景)

多くの慣用的な血液細胞単離手順は、密度勾配沈殿による赤血球成分および顆粒球成分の予備的バルク分離を含む。密度勾配分離は、異なる細胞型の密度の微小な差異（この差異により、これらの細胞は、種々の密度流体培地において異なるレベルで沈殿する）に依存する。これらの細胞型の間の密度の差異は、微小であり得、個々の細胞型は、大きさおよび密度が相同であり得る。最終的に、特定の細胞型は、その密度培地中の別々の領域で正確に沈殿するのではなく、密度勾配培地をとおして分離されるようになり得る。この現象は、所望の細胞の乏しい回収および/または所望されない細胞型での汚染を生じ得る。希少な血液細胞型（例えば、造血祖先細胞）を増やす手順において、密度勾配沈殿は、一般に、乏しい収率しか得られない。例えば、臍帯血から祖先細胞（例えば、CD34+造血幹細胞）を単離するための慣用的な密度勾配法は、所望される幹細胞の有意な損失を生じることが報告されている。例えば、非特許文献1を参照のこと。別の例としては、リンパ球を単離するために慣用的な密度勾配法を用いることは、特定のリンパ球サブセットの選択的な損失を生じることが報告されている。例えば、非特許文献2を参照のこと。

【0003】

ドナー組織からの希少な細胞型の回収を増加させることは、移植療法および免疫療法（例えば、骨髄移植、幹細胞ベース遺伝子療法、および免疫細胞療法）の成功を劇的に改善し、それらの成功は、明らかに、治療に用いられる細胞の正確な数に関連する。

【非特許文献1】Wagner, J. E., Am J Ped Hematol Oncol (1993) 15: 169

【非特許文献2】Collins, D. P., J Immunol Methods (2000) 243: 125

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0004】

(発明の要旨)

本発明は、細胞を分離するための組成物および方法を提供する。開示される組成物および方法は、例えば、組織培養、免疫表現系決定、他の診断試験、さらなる精製、および治療的投与のための細胞を効率的に調製するために用いられ得る。

【0005】

本発明の方法は、血液細胞を含むサンプル（例えば、末梢血液サンプル、臍帯サンプル、および骨髄サンプル）と、細胞分離組成物と接触させる工程を包含する。特定の機構に束縛されることなく、本発明の組成物は、細胞表面の抗原との相互作用を介して、および/または細胞-細胞の接着を刺激することによって（例えば、細胞表面の接着因子の増加した発現を介して）、選択的に細胞を凝集し得る。凝集した細胞は、溶液中に残る凝集していない細胞と分離される。凝集相または上清相のいずれかまたは両方から、細胞が回収され得る。

【0006】

開示される組成物および方法は、種々の細胞型（例えば、Tリンパ球、Tヘルパー細胞、Tサプレッサー細胞、B細胞、造血幹細胞、循環胚幹細胞、母体循環中の循環胎児細胞

10

20

30

40

50

、および循環転移腫瘍細胞を含む)を単離および増やすために用いられ得る。開示される組成物および方法は、同種異系および自系の移植に関連して用いられ得る。自系移植に関連して、開示される組成物および方法は、例えば、所望されない細胞(例えば、患者の血液または骨髄由来の転移がん細胞)を除去するために用いられ得る。次いで、所望の細胞(例えば、造血幹細胞)は、生命を脅かす腫瘍細胞を伴わないか、または実質的に伴わずに、患者に戻され得る。開示される組成物および方法は、ヒト、非ヒト脊椎動物、齧歯類、イノシシ、ウシ、およびウマを含む任意の哺乳動物細胞の細胞に適用され得る。

【0007】

細胞分離組成物は、デキストラン、抗グリコホリン抗体、および細胞表面抗原に対する抗体(例えば、CD9、CD15、CD2、CD3、CD4、CD8、CD72、CD16、CD41a、HLAクラスI、HLA-DR、CD29、CD11a、CD11b、CD11c、CD19、CD20、CD23、CD39、CD40、CD43、CD44、CDw49d、CD53、CD54、CD62L、CD63、CD66、CD67、CD81、CD82、CD99、CD100、Leu-13、TPA-1または表面Ig)、およびこれらの組み合わせを含み得る。細胞分離組成物は、他の型の細胞の表面抗原(例えば、腫瘍細胞の細胞表面タンパク質)に対する抗体を含み得る。

【0008】

細胞表面抗原に対する抗体は、可溶性形態および基材に結合された形態のいずれかまたはそれらの両方で細胞分離組成物中に含められ得る。抗体は、ラテックス微粒子、酸エッチングされたガラス粒子、凝集されたポリペプチド、多糖、アビジン粒子、またはビオチン化アガロースゲル粒子のような基材に結合され得る。細胞分離組成物における抗体は、モノクローナルであり得、そしてIgM抗体またはIgG抗体であり得る。いくつかの実施形態において、細胞分離は、抗ヒト抗体を含み得る。細胞分離組成物中の可溶性抗体の濃度は、約0.1mg/l~約15mg/lであり得る。基材結合抗体は、約0.1~約50.0×10⁹個粒子/lの間の濃度で、細胞分離組成物中に含められ得る。

【0009】

細胞分離組成物はまた、ヘパリン、二価カチオン(例えば、Ca²⁺、Mg²⁺)、およびリン酸緩衝化生理食塩水を含み得る。いくつかの実施形態において、組成物は、6.8~7.8(例えば、7.2~7.4の間)の間のpHを有する。

【0010】

本発明はまた、細胞分離組成物の成分および包装材料を含むキットを提供する。キットは、血液収集容器(血液バッグまたは減圧チューブ)を含み得る。

【0011】

本発明はさらに、以下を提供し得る：

・(項目1)

以下：

a) デキストラン；

b) 抗グリコホリンA抗体；

c) 抗CD15抗体；

d) 抗CD9抗体；ならびに

e) 抗CD3抗体、抗CD72抗体、抗CD16抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、および抗CD2抗体からなる群より選択される抗体、を含む、組成物。

・(項目2)

ヘパリンをさらに含む、項目1に記載の組成物。

・(項目3)

二価カチオンをさらに含む、項目1に記載の組成物。

・(項目4)

上記二価カチオンが、Ca²⁺である、項目3に記載の組成物。

・(項目5)

10

20

30

40

50

上記二価カチオンが、 Mg^{+2} である、項目3に記載の組成物。

・(項目6)

リン酸緩衝化生理食塩水をさらに含む、項目1に記載の組成物。

・(項目7)

上記組成物のpHが6.8~7.8である、項目1に記載の組成物。

・(項目8)

上記組成物のpHが7.2~7.4である、項目1に記載の組成物。

・(項目9)

上記抗グリコホリンA抗体がモノクローナルである、項目1に記載の組成物。

・(項目10)

上記抗グリコホリンA抗体がIgM抗体である、項目1に記載の組成物。

・(項目11)

上記抗グリコホリンA抗体がIgG抗体である、項目1に記載の組成物。

・(項目12)

上記抗グリコホリンA抗体がヒト抗グリコホリンA抗体である、項目1に記載の組成物。

・(項目13)

上記抗グリコホリンA抗体の濃度が約0.1mg/l~約15mg/lである、項目1に記載の組成物。

・(項目14)

上記抗CD15抗体が、モノクローナル抗体である、項目1に記載の組成物。

・(項目15)

上記抗CD15抗体が、IgM抗体である、項目1に記載の組成物。

・(項目16)

上記抗CD15抗体が、IgG抗体である、項目1に記載の組成物。

・(項目17)

上記抗CD15抗体が、抗ヒトCD15抗体である、項目1に記載の組成物。

・(項目18)

上記抗CD15抗体の濃度が約0.1mg/l~約15mg/lである、項目1に記載の組成物。

・(項目19)

上記抗CD9抗体が、モノクローナル抗体である、項目1に記載の組成物。

・(項目20)

上記抗CD9抗体が、IgM抗体である、項目1に記載の組成物。

・(項目21)

上記抗CD9抗体が、IgG抗体である、項目1に記載の組成物。

・(項目22)

上記抗CD9抗体が、ヒト抗CD9抗体である、項目1に記載の組成物。

・(項目23)

上記抗CD9抗体の濃度が約0.1mg/l~約15mg/lである、項目1に記載の組成物。

・(項目24)

血液収集容器および細胞分離組成物を備えるキットであって、当該細胞分離組成物が、以下：

a) デキストラン；

b) 抗グリコホリンA抗体；

c) 抗CD15抗体；

d) 抗CD9抗体；ならびに

e) 抗CD3抗体、抗CD72抗体、抗CD16抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、および抗CD2抗体からなる群より選択される抗体、

10

20

30

40

50

を含む、キット。

・ (項目 25)

上記血液収集容器が血液バッグである、項目 24 に記載のキット。

・ (項目 26)

上記血液収集容器が減圧チューブである、項目 24 に記載のキット。

・ (項目 27)

細胞を分離するための方法であって、当該方法は、以下：

a) 血液細胞を含むサンプルと組成物を接触させる工程；ならびに

b) 当該サンプルを凝集相と上清相とに分離させる工程；ならびに

c) 当該細胞を回収する工程、を包含し、

当該組成物が、以下：

i) デキストラン；

ii) 抗グリコホリン A 抗体；

iii) 抗 CD15 抗体；

iv) 抗 CD9 抗体；ならびに

v) 抗 CD3 抗体、抗 CD72 抗体、抗 CD16 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体

、および抗 CD2 抗体からなる群より選択される抗体、

を含む、方法。

・ (項目 28)

上記サンプルが、ヒト由来である、項目 27 に記載の方法。

・ (項目 29)

上記サンプルが、末梢血液サンプルである、項目 28 に記載の方法。

・ (項目 30)

上記サンプルが、臍帯サンプルである、項目 28 に記載の方法。

・ (項目 31)

上記サンプルが、骨髓サンプルである、項目 28 に記載の方法。

・ (項目 32)

上記細胞が、転移腫瘍細胞である、項目 28 に記載の方法。

・ (項目 33)

上記細胞が、上記上清相から回収される、項目 28 に記載の方法。

・ (項目 34)

上記細胞が幹細胞である、項目 33 に記載の方法。

・ (項目 35)

a) デキストラン；

b) 抗グリコホリン A 抗体；および

c) 細胞表面抗原に対する抗体であって、基材に結合されている抗体、

を含む、組成物。

・ (項目 36)

上記基材に結合された抗体が、ラテックス微粒子に結合されている、項目 35 に記載の組成物。

・ (項目 37)

上記基材に結合された抗体が、酸エッチングされたガラス粒子に結合されている、項目 35 に記載の組成物。

・ (項目 38)

上記基材に結合された抗体が、凝集したポリペプチドに結合されている、項目 35 に記載の組成物。

・ (項目 39)

上記基材に結合された抗体が、多糖に結合されている、項目 35 に記載の組成物。

・ (項目 40)

上記基材に結合された抗体が、アビジン粒子に結合されている、項目 35 に記載の組成物

10

20

30

40

50

°

・ (項目 4 1)

上記基材に結合された抗体が、ビオチン化アガロースゲル粒子に結合されている、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 4 2)

上記抗体が抗 C D 1 5 である、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 4 3)

上記抗体が抗 C D 9 である、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 4 4)

上記抗体が抗 C D 3 である、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 4 5)

上記抗体が抗 C D 7 2 である、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 4 6)

上記抗体が抗 C D 1 6 である、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 4 7)

上記抗体が抗 C D 4 である、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 4 8)

上記抗体が抗 C D 8 である、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 4 9)

上記抗体が抗 C D 2 である、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 5 0)

上記抗体が抗 C D 3 である、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 5 1)

ヘパリンをさらに含む、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 5 2)

二価カチオンをさらに含む、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 5 3)

上記二価カチオンが、 Ca^{+2} である、項目 5 2 に記載の組成物。

・ (項目 5 4)

上記二価カチオンが、 Mg^{+2} である、項目 5 2 に記載の組成物。

・ (項目 5 5)

リン酸緩衝化生理食塩水をさらに含む、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 5 6)

上記組成物の pH が 6 . 8 ~ 7 . 4 である、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 5 7)

上記組成物の pH が 7 . 2 ~ 7 . 4 である、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 5 8)

上記抗グリコホリン A 抗体がモノクローナルである、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 5 9)

上記抗グリコホリン A 抗体が I g M 抗体である、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 6 0)

上記抗グリコホリン A 抗体が I g G 抗体である、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 6 1)

上記抗グリコホリン A 抗体がヒト抗グリコホリン A 抗体である、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 6 2)

上記抗グリコホリン A 抗体の濃度が約 0 . 1 m g / l ~ 約 1 5 m g / l である、項目 3 5 に記載の組成物。

・ (項目 6 3)

上記抗グリコホリン A 抗体が、基材に結合されている、項目 3 5 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

・ (項目 6 4)

上記抗 C D 1 5 抗体が、モノクローナル抗体である、項目 4 2 に記載の組成物。

・ (項目 6 5)

上記抗 C D 1 5 抗体が、I g M 抗体である、項目 4 2 に記載の組成物。

・ (項目 6 6)

上記抗 C D 1 5 抗体が、I g G 抗体である、項目 4 2 に記載の組成物。

・ (項目 6 7)

上記抗 C D 1 5 抗体が、抗ヒト C D 1 5 抗体である、項目 4 2 に記載の組成物。

・ (項目 6 8)

上記抗 C D 1 5 抗体の濃度が約 0 . 1 m g / l ~ 約 1 5 m g / l である、項目 4 2 に記載の組成物。

・ (項目 6 9)

上記抗 C D 1 5 抗体が、基材に結合されている、項目 4 2 に記載の組成物。

・ (項目 7 0)

上記抗 C D 9 抗体が、モノクローナル抗体である、項目 4 3 に記載の組成物。

・ (項目 7 1)

上記抗 C D 9 抗体が、I g M 抗体である、項目 4 3 に記載の組成物。

・ (項目 7 2)

上記抗 C D 9 抗体が、I g G 抗体である、項目 4 3 に記載の組成物。

・ (項目 7 3)

上記抗 C D 9 抗体が、ヒト抗 C D 9 抗体である、項目 4 3 に記載の組成物。

・ (項目 7 4)

上記抗 C D 9 抗体の濃度が約 0 . 1 m g / l ~ 約 1 5 m g / l である、項目 4 3 に記載の組成物。

・ (項目 7 5)

上記抗 C D 9 抗体が、基材に結合されている、項目 4 3 に記載の組成物。

・ (項目 7 6)

血液収集容器および細胞分離組成物を備えるキットであって、当該細胞分離組成物が、以下：

a) デキストラン

b) 抗グリコホリン抗体；および

c) ヒト細胞の細胞表面抗原に対する抗原であって、基質に結合されている、抗体、を含む、キット。

・ (項目 7 7)

上記血液収集容器が血液バッグである、項目 7 6 に記載のキット。

・ (項目 7 8)

上記血液収集容器が減圧チューブである、項目 7 6 に記載のキット。

・ (項目 7 9)

細胞を分離するための方法であって、当該方法は、以下：

a) 血液細胞を含むサンプルと組成物を接触させる工程；ならびに

b) 外サンプルを凝集相と上清相とに分離させる工程；ならびに

c) 当該細胞を回収する工程、を包含し、

当該組成物が、以下：

i) デキストラン；

i i) 抗グリコホリン A 抗体；および

i i i) 細胞表面抗原に対する抗原であって、基質に結合されている、抗体、を含む、方法。

・ (項目 8 0)

上記サンプルが、ヒト由来である、項目 7 9 に記載の方法。

・ (項目 8 1)

10

20

30

40

50

上記サンプルが、末梢血液サンプルである、項目 8 0 に記載の方法。

・ (項目 8 2)

上記サンプルが、臍帯サンプルである、項目 8 0 に記載の方法。

・ (項目 8 3)

上記サンプルが、骨髓サンプルである、項目 8 0 に記載の方法。

・ (項目 8 4)

上記細胞が、転移腫瘍細胞である、項目 8 0 に記載の方法。

・ (項目 8 5)

上記細胞が、上記上清相から回収される、項目 8 0 に記載の方法。

・ (項目 8 6)

上記細胞が幹細胞である、項目 8 5 に記載の方法。

10

【 0 0 1 2 】

他に規定されない限り、本明細書中に使用される専門用語および科学用語は、本発明が関連する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および物質に類似するかまたはそれらと等価である方法および物質が、本発明を実施するために用いられ得るが、適切な方法および物質が、以下に記載される。本明細書中に記述される全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、それらの全体が、本明細書中に参考として援用される。矛盾する場合、定義を含めて、本明細書が、支配する。さらに、物質、方法、および実施例は、例示的であるのみであり、限定することを意図しない。

20

【 0 0 1 3 】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および上記の特許請求の範囲から明らかである。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 4 】

(詳細な説明)

本発明は、細胞を分離するための組成物および方法を特色とする。本発明の組成物を使用して、血球含有サンプルから細胞を選択的に凝集させ得る。特定の機構によって束縛されることなく、本発明の組成物は、細胞表面抗原との相互作用を介して、および / または細胞表面接着因子 (例えば、L F A - 1 (リンパ球機能関連抗原 - 1、C D 1 1 a / C D 1 8)、I C A M - 1 (細胞間接着分子 - 1、C D 5 4)) の発現を刺激することによって、細胞を凝集し得る。凝集された細胞の部分は、未凝集細胞とは区別され、この未凝集細胞は、溶液中に残る。細胞は、上清からか、または凝集塊から回収され得る。

30

【 0 0 1 5 】

(細胞分離組成物)

本発明に従う細胞分離組成物は、デキストラン、および細胞表面抗原に対する (すなわち、細胞表面抗原に対して特異的結合親和性を有する) 1 つ以上の抗体を含み得る。

【 0 0 1 6 】

デキストランは、主に α (1 ~ 6) 様式で連結されたグルコースユニットからなる多糖である。デキストランは、赤血球のスタッキング (すなわち、連鎖形成) を引き起こし得、これによって、溶液からの赤血球細胞の除去を容易にする。細胞表面抗原に対する抗体は、ホモタイプの凝集 (すなわち、同一細胞型の細胞の凝集) および / またはヘテロタイプの凝集 (すなわち、異なる細胞型の細胞の凝集) を介した、溶液からの血球の除去を容易にし得る。

40

【 0 0 1 7 】

細胞分離組成物は、血球表面抗原に対する抗体を含み得、例えば、以下を含む : グリコホリン A、C D 1 5、C D 9、C D 2、C D 3、C D 4、C D 8、C D 7 2、C D 1 6、C D 4 1 a、H L A クラス I、H L A - D R、C D 2 9、C D 1 1 a、C D 1 1 b、C D 1 1 c、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 3、C D 3 9、C D 4 0、C D 4 3、C D 4 4、C D w 4 9 d、C D 5 3、C D 5 4、C D 6 2 L、C D 6 3、C D 6 6、C D 6 7、C D 8

50

1、CD82、CD99、CD100、Leu-13、TPA-1、表面Ig、および、これらの組合せ。従って、細胞分離組成物は、特定の型の血球を選択的に凝集するために、処方され得る。

【0018】

いくつかの実施形態において、細胞分離組成物は、グリコホリンAに対する抗体を含む。抗グリコホリンA抗体は、少なくとも2つの機構によって、溶液からの血球細胞の除去を容易にし得る。1番目に、抗グリコホリンA抗体は、グリコホリンAが赤血球上の主要な表面糖タンパク質であるので、赤血球のホモタイプの凝集を引き起こし得る。さらに、抗グリコホリンA抗体はまた、デキストラン媒介連鎖形成を安定化し得る。例示的なモノクローナル抗グリコホリンA抗体としては、107FMN(マウスIgG1アイソタイプ)、YTH89.1(ラットIgG2bアイソタイプ)、およびE4(マウスIgMアイソタイプ)が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、M. Vanderlaanら、Molecular Immunology 20:1353(1983); Telen M. J. および Bolk, T. K., Transfusion 27:309(1987); ならびに Outram S.ら、Leukocyte Research. 12:651(1988)を参照のこと。

10

【0019】

いくつかの実施形態において、細胞分離組成物は、CD15に対する抗体を含む。抗CD15抗体は、顆粒球の表面上に存在するCD15分子を架橋することによって、顆粒球のホモタイプの凝集を引き起こし得る。抗CD15抗体はまた、単球上、NK細胞上およびB細胞上の接着分子と相互作用する顆粒球の表面上の接着分子(例えば、L-セレクチンおよびβ-2インテグリン)の発現を刺激することによって、顆粒球と単球、NK細胞およびB細胞とのホモタイプの凝集およびヘテロタイプの凝集を引き起こし得る。これらの細胞型のヘテロタイプの凝集は、血球成分と共に、溶液からのこれらの細胞の除去を容易にし得る。例示的なモノクローナル抗CD15抗体としては、AHN1.1(マウスIgMアイソタイプ)、FMC-10(マウスIgMアイソタイプ)、BU-28(マウスIgMアイソタイプ)、MEM-157(マウスIgMアイソタイプ)、MEM-158(マウスIgMアイソタイプ)、MEM-167(マウスIgMアイソタイプ)が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Leukocyte typing IV(1989); Leukocyte typing II(1984); Leukocyte typing VI(1995); Solter D.ら、Proceedings of National Academy of Sciences USA 75:5565(1978); Kannagi R.ら、Journal of Biological Chemistry 257:14865(1982); Magnani, J. L.ら、Archives of Biochemistry and Biophysics 233:501(1984); Eggens I.ら、Journal of Biological Chemistry 264:9476(1989)を参照のこと。

20

30

【0020】

いくつかの実施形態において、細胞分離組成物は、CD9に対する抗体を含む。抗CD9抗体は、血小板のホモタイプの凝集を引き起こし得る。抗CD9抗体はまた、顆粒球および単球の表面に接着している血小板を介して、顆粒球および単球のヘテロタイプの凝集を引き起こし得る。CD9抗体は、血小板1セレクチンの発現を促進し得、この血小板1セレクチンは、白血球細胞表面への血小板の結合を促進する。従って、抗CD9抗体は、複数の細胞-細胞連結を促進し得、これによって、凝集および溶液からの除去を促進する。例示的なモノクローナル抗CD9抗体としては、MEM-61(マウスIgG1アイソタイプ)、MEM-62(マウスIgG1アイソタイプ)、MEM-192(マウスIgMアイソタイプ)、FMC-8(マウスIgG2aアイソタイプ)、SN4(マウスIgG1アイソタイプ)、BU-16(マウスIgG2aアイソタイプ)が挙げられるが、これらに限定されない。Leukocyte typing VI(1995); Leukocyte typing II(1984); Leukocyte typing IV(W

40

50

. Knapp 編) pp. 989 - 92. Oxford University Press, Oxford 中の Von dem Bourne A. E. G, Kr. および Moderman P. N. (1989); Leukocyte typing V, S. F. Schlosmann 編, pp. 1249 - 51. Oxford University Press, Oxford (1995) 中の Jennings, L. K., 5; Lanza F. 5、Journal of Biological Chemistry 266: 10638 (1991); Wright 5、Immunology Today 15: 588 (1994); Rubinstein E. 5、Seminars in Thrombosis and Hemostasis 21: 10 (1995) を参照のこと。

10

【0021】

いくつかの実施形態において、細胞分離組成物は、CD41 に対する抗体を含み、これは、選択的に血小板を凝集し得る。いくつかの実施形態において、細胞分離組成物は、CD3 に対する抗体を含み、これは、選択的に T 細胞を凝集し得る。いくつかの実施形態において、細胞分離組成物は、CD2 に対する抗体を含み、これは、T 細胞および NK 細胞を選択的に凝集し得る。いくつかの実施形態において、細胞分離組成物は、CD72 に対する抗体を含み得、これは、B 細胞を選択的に凝集し得る。いくつかの実施形態において、細胞分離組成物は、CD16 に対する抗体を含み、これは、NK 細胞および好中球性顆粒球を選択的に凝集し得る。

20

【0022】

上記した通り、細胞分離組成物は、特定の血球を選択的に凝集するために処方され得る。例として、グリコホリン A、CD15 および CD9 に対する抗体を含む細胞分離組成物は、赤血球、顆粒球、NK 細胞、B 細胞および血小板の凝集を容易にし得る。T 細胞、NK 細胞および珍しい前駆体細胞は、次いで、溶液から回収され得る。処方物がまた、CD3 に対する抗体を含む場合、T 細胞はまた凝集され得、そして、NK 細胞および珍しい前駆体は、溶液から回収され得る。

【0023】

細胞分離組成物は、他の型の細胞の表面抗原（例えば、腫瘍細胞の細胞表面タンパク質）に対する抗体を含み得る。当業者は、慣用的な方法を使用して、血液、ならびに他のヒトおよび他の哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギおよびモルモット）、ブタ、ウシおよびウマを含む）由来の細胞の細胞表面抗原に対する抗体を調製し得る。

30

【0024】

代表的には、この組成物中で使用される抗体は、モノクローナル抗体で、これは、抗原内に含まれる特定のエピトープに対する、均質な抗体の集団である。適切なモノクローナル抗体は市販されているか、または、標準的なハイブリドーマ技術を使用して調製され得る。特に、モノクローナル抗体は、培養中の連続細胞株による抗体分子の産生を提供する技術によって得られ得、この技術は、以下を含む：Kohler, G 5、Nature, 1975, 256: 495, ヒト B - 細胞ハイブリドーマ技術 (Kosbor 5、Immunology Today 4: 72 (1983); Cole 5、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026 (1983))、および EBV - ハイブリドーマ技術 (Cole 5、「Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy」Alan R. Liss, Inc., pp. 77 - 96 (1983)) によって記載される技術。

40

【0025】

抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD およびそれらの任意のサブクラスを含む、任意の免疫グロブリンクラスの抗体であり得る。IgG および IgM アイソタイプの抗体は、特に、本発明の細胞分離組成物中で有用である。五量体の IgM 抗体は、IgG 抗体よりも多くの抗原結合部位を含み、そして、いくつかの場合（例えば、抗グリコホリン A および抗 CD15）では、細胞分離試薬にとって特に有用である。他の場合（例え

50

ば、抗CD9抗体)において、IgGアイソタイプの抗体は、ホモタイプの凝集および/またはヘテロタイプの凝集を刺激するのに特に有用である。

【0026】

細胞表面抗原に対する抗体は、液相中で(すなわち、可溶性で)提供され得る。液相抗体は、代表的には、約0.1mg/l~約15mg/lの間(例えば、0.25~10mg/lの間、0.25~1mg/lの間、0.5~2mg/lの間、1~2mg/lの間、4~8mg/lの間、5~10mg/lの間)の濃度で、細胞分離組成物中に提供される。

【0027】

細胞表面抗原に対する抗体もまた、固相に結合(すなわち、基質結合)して提供され得る。異なる細胞表面抗原に対する抗体は、細胞表面分子の架橋および細胞表面接着分子の活性化の促進のために、固相に共有結合され得る。基質結合抗体の使用は、(例えば、粒子が凝集化細胞に寄与する質量によってか、または、精製に有用な特性によって)細胞分離を容易にし得る。

【0028】

いくつかの実施形態において、基質結合抗体が結合される固相は、微粒子である。いくつかの実施形態において、抗体は、(例えば、ビオチン-アビジン結合、ポリスチレンビーズ上のCOO基への共有結合、または改変ビーズ上のNH₂基への共有結合を介して)ラテックス微粒子(例えば、常磁性ビーズ)に結合される。いくつかの実施形態において、抗体は、(例えば、ビオチン-アビジン結合を介して)酸エッチングしたガラス粒子に結合される。いくつかの実施形態において、抗体は、(ビオチン-アビジン結合、または、ポリペプチドのCOO基またはNH₂基への共有結合を介して)凝集化ウシ血清アルブミンのような凝集化ポリペプチドに結合される。いくつかの実施形態において、抗体は、高分子量(例えば、約1,000,000M_rより大きい)のデキストランサルフェートのような多糖に共有結合される。いくつかの実施形態において、ビオチン化抗体は、アビジン粒子に結合され、アビジン分子あたり4つの抗体分子を有する、四量体複合体を作製する。いくつかの実施形態において、抗体は、ビオチン-アビジン-ビオチン化抗体結合を介して、ビオチン化アガロースゲル粒子(One Cell Systems, Cambridge, MA, U.S.A.)に結合される。このような粒子は、代表的に、約300~500ミクロンの大きさであり、そして、超音波水浴においてか、または、迅速な混合水浴において、作製され得る。

【0029】

細胞-基質粒子(すなわち、細胞および基質結合抗体を含む粒子)は、凝集塊として、溶液から沈澱し得る。細胞-基質粒子はまた、例えば、粒子が常磁性ビーズである場合のように、適用された磁場によって、溶液から回収され得る。基質-結合抗体は、代表的には、細胞分離組成物中で、約0.1~約50.0×10⁹粒子/lの間(例えば、0.25~10.0×10⁹粒子/lの間、1~20.0×10⁹粒子/lの間、2~10.0×10⁹粒子/lの間、0.5~2×10⁹粒子/lの間、2~5×10⁹粒子/lの間、5~10×10⁹粒子/lの間、および10~30×10⁹粒子/lの間)の濃度にて、細胞分離組成物中で提供される。ここで、粒子は、そこに結合された抗体を有する固相粒子をいう。

【0030】

細胞分離組成物はまた、二価カチオン(例えば、Ca²⁺およびMg²⁺)を含み得る。二価カチオンは、例えば、平衡塩類溶液(例えば、ハンス平衡塩類溶液)によって、提供され得る。Ca²⁺イオンは、報告によれば、セレクチン媒介細胞-細胞接着およびインテグリン媒介細胞-細胞接着に重要である。

【0031】

本発明の細胞分離組成物はまた、ヘパリンのような抗凝固剤を含み得る。ヘパリンは、血餅、および高カルシウム環境における血餅に関連する非特異的細胞消失を防ぎ得る。ヘパリンはまた、血小板凝集化を促進し得る。凝集された血小板は、顆粒球および単球に接

10

20

30

40

50

着し得、これによって、単一血小板よりもヘテロタイプの凝集を増強する。ヘパリンは、ヘパリン塩（例えば、ヘパリンナトリウム、ヘパリンリチウム、または、ヘパリンカリウム）として供給され得る。

【0032】

（細胞分離方法）

開示された組成物は、例えば、組織培養、免疫表現型の特徴付け、他の診断試験、さらなる精製、および治療的投与のための細胞を効率的に調製するために、使用され得る。特定の機構に束縛されることなく、本発明の組成物は、細胞表面抗原との相互作用を介して、および/または、細胞-細胞接着を刺激することによって（例えば、細胞表面接着因子の発現を増大することによって）、選択的に細胞を凝集し得る。凝集された細胞の部分は、凝集されていない細胞（これは、溶液中に残る）とは区別される。

10

【0033】

凝集の後、凝集されていない細胞は、溶液相から回収され得る。細胞はまた、凝集塊から回収され得る。凝集された細胞は、例えば、二価カチオンキレート剤（例えば、EDTAまたはEGTA）を含む緩衝液に、この細胞を移すことによって、分離され得る。凝集塊から回収された細胞は、細胞表面抗原に対する抗体を用いることによって、さらに分離され得る。細胞はこの凝集塊を融点をちょうど超える温度まで加熱することによって、ゲル微粒子-抗体-細胞凝集物から回収され得る。

【0034】

開示された組成物は、種々のサンプル（末梢血液（例えば、静脈穿刺によって得られる）、臍帯血（例えば、妊娠後得る）、および、骨髓（例えば、吸引から）を含む）から細胞を分離するために使用され得る。血球含有サンプルを細胞分離組成物と接触させ、特定の型の細胞の凝集を引き起こし得る。例えば、赤血球および分化骨髓性血液成分は、抗体を含む細胞分離組成物を使用して、これらの細胞の表面抗原に選択的に凝集され得る。開示される組成物および方法は、種々の細胞型（例えば、Tリンパ球、Tヘルパー細胞、Tサブレッサー細胞、B細胞、造血幹細胞、循環胚幹細胞、母系循環中の循環胎児細胞、および循環転移性腫瘍細胞を含む）を単離および濃縮するために使用され得る。開示された組成物は、任意の哺乳動物（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類、ブタ、ウシおよびウマ）の細胞を凝集するために使用され得る。

20

【0035】

開示される組成物および方法は、同種異系移植および自系移植との関連で使用され得る。自系移植に関連して、開示される組成物および方法が、例えば、患者の血液または骨髓から所望されない細胞（例えば、転移性癌細胞）を除去するために使用され得る。所望の細胞（例えば、造血幹細胞）は、次いで、生命に関わる腫瘍細胞なしでか、または、これらの細胞がない状態で、患者に戻され得る。

30

【0036】

腫瘍細胞の細胞表面タンパク質に対する抗体を含む細胞分離組成物は、患者の血液または骨髓から腫瘍細胞を取り除くために、使用され得る。このような組成物をまた、診断手順のために使用して、例えば、凝集塊中の腫瘍細胞を取得および検出し得、ここで、これらの腫瘍細胞は濃縮され、これによって、循環血液または骨髓中よりも容易に検出可能である。上皮成長因子のためのレセプターに対する抗体を含む細胞分離組成物は、上皮腫瘍（例えば、頭頸腫瘍）由来の腫瘍細胞を凝集するために使用され得る。エストロゲンレセプターに対する抗体を含む細胞分離組成物は、乳癌および卵巣癌由来の腫瘍細胞を凝集するために使用され得る。表面免疫グロブリンに対する抗体を含む細胞分離組成物は、慢性リンパ性白血病、プラズマ細胞腫および多発骨髓腫に関連する腫瘍細胞を凝集するために使用され得る。乳癌細胞は、その細胞表面上でCD15を発現し、そして、CD15に対する抗体を含む細胞分離物を使用して、骨髓から取り除かれ得る。他の処方物を、細胞型および細胞表面タンパク質に基づいて作製し、患者の血液または骨髓からの他の癌（例えば、赤白血病、内皮癌および胃腸癌）由来の転移性腫瘍細胞を取得し得るか、または除去し得る。

40

50

【0037】

(細胞分離キット)

細胞分離組成物は、包装材料と組合せられ得、そして、キットとして販売され得る。細胞分離組成物の成分は、個々にか、または、互いに組み合わせられて包装され得る。いくつかの実施形態において、包装材料は、血液回収容器(例えば、血液バッグ、真空チューブ)を含む。キット中に含まれる包装材料は、代表的に、細胞分離組成物をどのように使用して特定の型の細胞を凝集し得るかを記載する使用説明書かまたはラベルを含む。このようなキットを産生するための成分および方法は、周知である。

【0038】

本発明はさらに、以下の実施例中で記載され、これらの実施例は、特許請求の範囲中に記載の本発明の範囲を限定しない。

10

【実施例】

【0039】

(実施例)

(実施例1：血球の分離)

本実施例は、以下に記載の細胞分離試薬を使用して細胞を分離する一般的な方法を記載する。等容量の細胞分離試薬(すなわち25ml)を、50mlのコニカルチューブ中で、等容量のEDTA抗結合体化ヘパリン化末梢血液サンプル(すなわち、25ml)と合わせた。20×10⁶細胞/mlより多い白血球数を含むサンプルを、血液の1部と、細胞分離試薬の2部で合わせた。チューブを、室温で、30~45分間、ロッカーブラットホーム上で穏やかに混合した。チューブを、30~50分間、ラック中に真っ直ぐに立て、凝集した細胞と凝集していない細胞(この細胞は、溶液中に残る)とを区別した。凝集塊を捨てることなく、ピペットを使用して、上清から凝集していない細胞を除去した。回収した細胞を、25mlのPBSで洗浄し、500×gで7分間、遠心分離した。細胞ペレットを、4mlのPBS中に再懸濁した。

20

【0040】

細胞をまた、エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)およびエチレングリコール-ビス(2-アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-テトラ酢酸(EGTA)を含む低張性溶解溶液を使用して、凝集塊から回収した。凝集した細胞を、25mlのVitalyseTM(BioErgonomics, St, Paul, MN)で処理し、そして、ボルテックスした。10分後、細胞を、印加磁場に曝露して、常磁性ビーズに結合する抗体に結合した細胞を回収するか、または、500×gで7分間遠心分離して、上清を除去するかのどちらかをした。いずれの場合でも、細胞を、4mlのPBSに再懸濁した。

30

【0041】

赤血球、白血球、リンパ球、単球、顆粒球、T細胞、B細胞およびNK細胞の回収を、フローサイトメトリーおよび免疫表現型の決定によって、決定した。フローサイトメトリーの前に、白血球回収(すなわち、白血球細胞数)を、Coulter Onyx Hematology Analyzerで決定し、そして、サンプルを、PBSを用いて、1×10⁷細胞/mlの細胞数に調整した。容積を調整したサンプルの100μlアリコート、FITC標識化抗CD3抗体(T細胞反応性)か、PE標識化抗CD19抗体(B細胞反応性)か、またはPE標識化抗CD16抗体(NK細胞反応性)のいずれかで、15~30分間、暗中で室温にて染色した。2mlのPBSを各サンプルに添加し、次いで、このサンプルをボルテックスして、そして遠心分離して細胞をペレット化した。上清を捨てて、そして細胞ペレットをボルテックスし、そして0.5mlのPBS中に再懸濁した。染色細胞および非染色細胞を、Coulter XLフローサイトメータ-を使用して、フローサイトメトリーにより分析した。赤血球、白血球、リンパ球、単球、顆粒球および血小板を、診断的な前進光散乱特性および側光散乱特性に基づいて、同定した。B細胞、T細胞、およびNK細胞を、標識化抗体による光散乱および染色に基づいて同定した。

40

【0042】

50

(実施例 2 : 赤血球凝集)

表 1 に記載の試薬を使用して、実施例 1 に記載の方法に従って細胞を分離した。

【 0 0 4 3 】

【 表 1 】

表 1

デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/l
ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 ml/l
ヘパリンナトリウム (10,000 ユニット/ml)	1 ml/l
ハンクス平衡塩類溶液 (pH 7.2-7.4)	50 ml/l
抗ヒトグリコホリン A (マウス IgM モノクローナル抗体クローン E4)	1.0 mg/l

10

【 0 0 4 4 】

分離の結果を表 2 に示す。赤血球を、上清から 99.7% 除去した。リンパ球 (T 細胞、B 細胞および NK 細胞) は、単球および顆粒球に対して、上清中で濃縮された。

【 0 0 4 5 】

【 表 2 】

表 2

	分離前	分離後
赤血球 / ml	4.41×10^9	0.015×10^9
白血球 / ml	5.9×10^6	5.3×10^6
リンパ球 (%)	28.7	41.9
単球 (%)	8.69	4.78
顆粒球 (%)	62.5	52.6
T 細胞 (CD3+)	19.7	31.8
B 細胞 (CD19+)	4.46	5.42
NK 細胞 (CD16+)	3.15	5.9

20

【 0 0 4 6 】

(実施例 3 : 赤血球および CD2+ 細胞の凝集)

表 3 に記載する試薬を使用して、実施例 1 に記載する方法に従って、細胞を分離した。

30

【 0 0 4 7 】

【 表 3 】

表 3

デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/l
ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 ml/l
ヘパリンナトリウム (10,000 単位 /ml)	1 ml/l
ハンクス 平衡化塩溶液 (pH 7.2-7.4)	50 ml/l
抗ヒトグリコホリン A (マウス IgM モノクローナル抗体、クローン E4)	1.0 mg/l
抗ヒト CD2 常磁性凝集粒子 (ビオチン標識されたマウス抗ヒト CD2 クローン d118.10.1 の飽和用量で標識された、アビジンでコーティングされた直径 4.3 ミクロンの常磁性ポリスチレン粒子)	14.02×10^9 粒子 /l

40

【 0 0 4 8 】

分離の結果を表 4 に示す。上清中においては、赤血球を 99.7% 除去し、T 細胞を 95.1% 除去し、そして NK 細胞を 69.1% 除去した。B 細胞は他の細胞と比べて、上清中に多く含まれた。

【 0 0 4 9 】

【表 4】

表 4

	分離前	分離後
赤血球 数/ml	4.41×10^9	0.014×10^9
白血球 数/ml	5.9×10^6	2.63×10^6
リンパ球 (%)	28.7	16.0
単球 (%)	8.69	6.04
顆粒球 (%)	62.5	75.6
T 細胞 (CD3+)	19.7	3.3
B 細胞 (CD19+)	4.46	9.63
NK 細胞 (CD16+)	3.15	4.32

10

【0050】

(実施例 4 : 赤血球および CD72 + 細胞の凝集)

表 5 に記載する試薬を使用して、実施例 1 に記載する方法に従って、細胞を分離した。

【0051】

【表 5】

表 5

デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/l
ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 ml/l
ヘパリンナトリウム (10,000 単位 /ml)	1 ml/l
ハンクス平衡化塩溶液 (pH 7.2-7.4)	50 ml/l
抗ヒトグリコホリン A (マウス IgM モノクローナル抗体, クローン E4)	1.0 mg/l
抗ヒト CD72 常磁性凝集粒子 (ビオチン標識されたマウス抗ヒト CD72 クローン BU40 の飽和用量で標識された、アビジンでコーティングされた直径 4.3 ミクロンの常磁性ポリスチレン粒子)	2.63×10^6 粒子 /ml

20

【0052】

分離の結果を表 6 に示す。上清中においては、赤血球を 99.5% 除去し、そして B 細胞を 81.6% 除去した。

30

【0053】

【表 6】

表 6

	分離前	分離後
赤血球 数/ml	4.41×10^9	0.021×10^9
白血球 数/ml	5.9×10^6	3.2×10^6
リンパ球 (%)	28.7	47.0
単球 (%)	8.69	4.78
顆粒球 (%)	62.5	47.7
T 細胞 (CD3+)	19.7	41.3
B 細胞 (CD19+)	4.46	2.75
NK 細胞 (CD16+)	3.15	4.77

40

【0054】

(実施例 5 : 赤血球、CD15 + 細胞および CD9 + 細胞の凝集)

表 7 に記載する試薬を使用して、実施例 1 に記載する方法に従って細胞を分離した。

【0055】

【表 7】

表 7

デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/l
ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 ml/l
ヘパリンナトリウム (10,000 単位 /ml)	1 ml/l
ハンクス平衡化塩溶液 (pH 7.2-7.4)	50 ml/l
抗ヒトグリコホリン A (マウス IgM モノクローナル抗体, クローン E4)	0.1 - 15 mg/l (好ましくは約 1.0 mg/l)
抗 CD15 (マウス IgM モノクローナル抗体, クローン MEM-158)	0.1 - 15 mg/l (好ましくは約 1.0 mg/l)
抗 CD9 (マウス IgG モノクローナル抗体, クローン MEM-61)	0.1 - 15 mg/l (好ましくは約 1.0 mg/l)

10

【0056】

分離の結果を表 8 に示す。上清中においては、赤血球を 99.9% 除去し、単球および顆粒球を 99.8% 除去し、B 細胞を 74% 除去し、そして NK 細胞を 64.9% 除去した。さらに、分離前には 2.26×10^6 個/ml で上清中に存在した血小板を、99.4% 除去し、 1.4×10^6 個/ml までに除去した。

【0057】

【表 8】

表 8

	分離前	分離後
赤血球 数/ml	4.41×10^9	0.006×10^9
白血球 数/ml	5.9×10^6	1.53×10^6
リンパ球 (%)	28.7	99.0
単球 (%)	8.69	0.12
顆粒球 (%)	62.5	.083
T 細胞 (CD3+)	19.7	83.2
B 細胞 (CD19+)	4.46	8.10
NK 細胞 (CD16+)	3.15	8.43

20

【0058】

(実施例 6 : 赤血球、CD15+ 細胞、CD9+ 細胞および CD2+ 細胞の凝集)

表 9 に記載する試薬を使用して、実施例 1 に記載する方法に従って、細胞を分離した。

30

【0059】

【表 9】

表 9

デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/l
ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 ml/l
ヘパリンナトリウム (10,000 単位 /ml)	1 ml/l
ハンクス平衡化塩溶液 (pH 7.2-7.4)	50 ml/l
抗ヒトグリコホリン A (マウス IgM モノクローナル抗体, クローン E4)	1 mg/l
抗 CD15 (マウス IgM モノクローナル抗体, クローン MEM-158)	1 mg/l
抗 CD9 (マウス IgG モノクローナル抗体, クローン MEM-61)	1 mg/l
抗ヒト CD2 常磁性凝集粒子 (ビオチン標識されたマウス抗ヒト CD2 クローン d118.10.1 の飽和用量で標識された、アビジンでコーティングされた直径 4.3 ミクロンの常磁性ポリスチレン粒子)	14.02×10^9 粒子/l

40

【0060】

分離の結果を表 10 に示す。上清中においては、赤血球を 99.9% 除去し、単球およ

50

び顆粒球を 99.9% 除去し、B 細胞を 16.8% 除去し、NK 細胞を 29% 除去し、そして T 細胞を 91.5% 除去した。さらに、分離前には 2.26×10^6 個/ml で上清中に存在した血小板を、99.9% 除去し、 0.3×10^6 個/ml までに除去した。

【0061】

【表 10】

表 10

	分離前	分離後
赤血球 数/ml	4.41×10^9	0.005×10^9
白血球 数/ml	5.9×10^6	1.26×10^6
リンパ球 (%)	28.7	99.8
単球 (%)	8.69	0.06
顆粒球 (%)	62.5	0.09
T 細胞 (CD3+)	19.7	6.78
B 細胞 (CD19+)	4.46	69.5
NK 細胞 (CD16+)	3.15	20.7

10

【0062】

(実施例 7: 赤血球、CD15+ 細胞、CD9+ 細胞および CD72+ 細胞の凝集)

表 11 に記載する試薬を使用して、実施例 1 に記載する方法に従って、細胞を分離した。

【0063】

20

【表 11】

表 11

デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/l
ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 ml/l
ヘパリンナトリウム(10,000 単位/ml)	1 ml/l
ハンクス 平衡化塩溶液 (pH 7.2-7.4)	50 ml/l
抗ヒトグリコホリン A (マウス IgM モノクローナル抗体, クローン E4)	1 mg/l
抗 CD15 (マウス IgM モノクローナル抗体, クローン MEM-158)	1 mg/l
抗 CD9 (マウス IgG モノクローナル抗体, クローン MEM-61)	1 mg/l
抗ヒト CD72 常磁性凝集粒子 (ビオチン標識されたマウス抗ヒト CD72 クローン BU40 の飽和用量で標識された、アビジンでコーティングされた直径 4.3 ミクロンの常磁性ポリスチレン粒子)	2.63×10^9 粒子/l

30

【0064】

分離の結果を表 12 に示す。上清中においては、赤血球を 99.9% 除去し、単球を検出限界を越えて除去し、顆粒球を 99.97% 除去し、B 細胞を 97.2% 除去し、NK 細胞を 54.9% 除去した。さらに、分離前には 2.26×10^6 個/ml で上清中に存在した血小板を、99.96% 除去し、 0.1×10^6 個/ml までに除去した。

【0065】

40

【表 12】

表 12

	分離前	分離後
赤血球 数/ml	4.41×10^9	0.006×10^9
白血球 数/ml	5.9×10^6	2.3×10^6
リンパ球 (%)	28.7	99.9
単球 (%)	8.69	0
顆粒球 (%)	62.5	0.1
T 細胞 (CD3+)	19.7	92.4
B 細胞 (CD19+)	4.46	0.59
NK 細胞 (CD16+)	3.15	7.02

10

【0066】

(実施例 8 : 赤血球、CD15+細胞、CD9+細胞、CD19+細胞およびCD16+細胞の凝集)

表 13 に記載する試薬を使用して、実施例 1 に記載する方法に従って、細胞を分離した。T 細胞および CD3+細胞を上清から回収した。B 細胞および顆粒球を凝集物から回収する。

【0067】

【表 13】

表 13	
デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/l
ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 ml/l
ハンクス 平衡化塩溶液 (pH 7.2-7.4)	50ml/l
ヘパリンナトリウム(10,000 単位/ml)	1 ml/l
抗ヒトグリコホリン A (マウス IgM モノクローナル抗体, クローン E4)	0.1-15 mg/l (好ましくは約 1.0 mg/l)
抗ヒトCD15(マウス IgM モノクローナル抗体, クローン MEM-158)	0.1-15 mg/l (好ましくは約 1.0 mg/l)
抗ヒトCD9(マウス IgG モノクローナル抗体, クローン MEM-61)	0.1-15 mg/l (好ましくは約 1.0 mg/l)
抗ヒトCD19 常磁性凝集粒子 (ビオチン標識されたマウス抗ヒト CD19 クローン HIB19 の飽和用量で標識された、アビジンでコーティングされた直径 4.3 ミクロンの常磁性ポリスチレン粒子)	$0.1-30.0 \times 10^9$ 粒子/l (好ましくは 約 19.8×10^9 粒子/l)
抗ヒトCD16 常磁性凝集粒子 (ビオチン標識されたマウス抗ヒト CD16 クローン 3G8 の飽和用量で標識された、アビジンでコーティングされた直径 4.3 ミクロンの常磁性ポリスチレン粒子)	5.5×10^{11} 粒子/l

20

30

【0068】

(実施例 9 : 赤血球、CD15+細胞、CD9+細胞、CD19+細胞、CD16+細胞およびCD4+細胞の凝集)

表 14 に記載する試薬を使用して、実施例 1 に記載する方法に従って、細胞を分離した。CD8+細胞を上清から回収した。

40

【0069】

【表 14】

表 14	
デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/l
ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 ml/l
ヘパリンナトリウム (10,000 単位 /ml)	1 ml/l
ハンクス 平衡化塩溶液 (pH 7.2-7.4)	50ml/l
抗ヒトグリコホリン A (マウス IgM モノクローナル抗体, クローン E4)	0.1-15 mg/l (好ましくは 約 1.0 mg/l)
抗ヒトCD15 (マウス IgM モノクローナル抗体, クローン MEM-158)	0.1-15 mg/l (好ましくは 約 1.0 mg/l)
抗ヒトCD9 (マウス IgG モノクローナル抗体, クローン MEM-61)	0.1-15 mg/l (好ましくは 約 1.0 mg/l)
抗ヒトCD19 常磁性凝集粒子 (ビオチン標識されたマウス抗ヒトCD19クローン HIB19の飽和用量で標識された、アビジンでコーティングされた直径4.3ミクロンの常磁性ポリスチレン粒子)	$0.1-30.0 \times 10^9$ 粒子/l (好ましくは 約 19.8×10^9 粒子/l)
抗ヒトCD16 常磁性凝集粒子 (ビオチン標識されたマウス抗ヒトCD16クローン 3G8の飽和用量で標識された、アビジンでコーティングされた直径4.3ミクロンの常磁性ポリスチレン粒子)	5.5×10^{11} 粒子/l
抗ヒトCD4 常磁性凝集粒子 (ビオチン標識されたマウス抗ヒトCD4のクローンRFT4-γまたはクローンQS4120の飽和用量で標識された、アビジンでコーティングされた直径4.3ミクロンの常磁性ポリスチレン粒子)	1.2×10^{10} 粒子/l

10

20

【0070】

(実施例 10 : 赤血球、CD15 + 細胞、CD9 + 細胞、CD19 + 細胞、CD16 + 細胞およびCD8 + 細胞の凝集)

表 15 に記載する試薬を使用して、実施例 1 に記載する方法に従って、細胞を分離する。CD4 + 細胞を上清から回収する。

【0071】

【表 15】

表 15	
デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/l
ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 ml/l
ヘパリンナトリウム (10,000 単位/ml)	1 ml/l
ハンクス 平衡化塩溶液 (pH 7.2-7.4)	50ml/l
抗ヒトグリコホリン A (マウス IgM モノクローナル抗体, クローン E4)	0.1-15 mg/l (好ましくは 約 1.0 mg/l)
抗ヒトCD15(マウス IgM モノクローナル抗体, クローン MEM-158)	0.1-15 mg/l (好ましくは 約 1.0 mg/l)
抗ヒトCD9(マウス IgG モノクローナル抗体, クローン MEM-61)	0.1-15 mg/l (好ましくは 約 1.0 mg/l)
抗ヒトCD19 凝集粒子 (ビオチン標識されたマウス抗ヒトCD19クローン HIB19の飽和用量で標識された、アビジンでコーティングされた直径4.3ミクロンの常磁性ポリスチレン粒子)	0.1-30.0 x 10 ⁹ 粒子/l (好ましくは 約 19.8 x 10 ⁹ 粒子/l)
抗ヒトCD16 凝集粒子 (ビオチン標識されたマウス抗ヒトCD16クローン 3G8の飽和用量で標識された、アビジンでコーティングされた直径4.3ミクロンの常磁性ポリスチレン粒子)	5.5 x 10 ¹¹ 粒子/l
抗ヒトCD8 凝集粒子 (ビオチン標識されたマウス抗ヒトCD8クローン HIT8aの飽和用量で標識された、アビジンでコーティングされた直径4.3ミクロンの常磁性ポリスチレン粒子)	7.92 x 10 ⁹ 粒子/l

10

20

【0072】

(実施例 11: 赤血球、CD15 + 細胞、CD9 + 細胞、CD19 + 細胞およびCD2 + 細胞の凝集)

表 16 に記載する試薬を使用して、実施例 1 に記載する方法に従って、細胞を分離した。CD34 + 細胞を、> 50% の純度かつ > 80% の収率で上清から回収した。

【0073】

【表 16】

表 16	
デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/l
ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 ml/l
ヘパリンナトリウム (10,000 単位/ml)	1 ml/l
ハンクス 平衡化塩溶液 (pH 7.2-7.4)	50ml/l
抗ヒトグリコホリン A (マウス IgM モノクローナル抗体, クローン E4)	0.1-15 mg/l (好ましくは 約 1.0 mg/l)
抗ヒトCD15(マウス IgM モノクローナル抗体, クローン MEM-158)	0.1-15 mg/l (好ましくは 約 1.0 mg/l)
抗ヒトCD9(マウス IgG モノクローナル抗体, クローン MEM-61)	0.1-15 mg/l (好ましくは 約 1.0 mg/l)
抗ヒトCD19 凝集粒子 (ビオチン標識されたマウス抗ヒトCD19クローン HIB19の飽和用量で標識された、アビジンでコーティングされた直径4.3ミクロンの常磁性ポリスチレン粒子)	0.1-30.0 x 10 ⁹ 粒子/l (好ましくは 約 19.8 x 10 ⁹ 粒子/l)
抗ヒトCD2 凝集粒子 (ビオチン標識されたマウス抗ヒトCD2クローン d118.10.1の飽和用量で標識された、アビジンでコーティングされた直径4.3ミクロンの常磁性ポリスチレン粒子)	0.1-30.0 x 10 ⁹ 粒子/l (好ましくは 約 3.0 x 10 ¹⁰ 粒子/l)

30

40

【0074】

(実施例 12: 赤血球、CD15 + 細胞、CD9 + 細胞、CD2 + 細胞およびCD16

50

+ 細胞の凝集)

表 17 に記載する試薬を使用して、実施例 1 に記載する方法に従って、細胞を分離した。B 細胞を上清から回収した。

【 0 0 7 5 】

【 表 1 7 】

表 17	
デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/l
ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 ml/l
ヘパリンナトリウム (10,000 単位/ml)	1 ml/l
ハンクス 平衡化塩溶液 (pH 7.2-7.4)	50ml/l
抗ヒトグリコホリン A (マウス IgM モノクローナル抗体, クローン E4)	0.1-15 mg/l (好ましくは 約 1.0 mg/l)
抗ヒトCD15(マウス IgM モノクローナル抗体, クローン MEM-158)	0.1-15 mg/l (好ましくは 約 1.0 mg/l)
抗ヒトCD9(マウス IgG モノクローナル抗体, クローン MEM-61)	0.1-15 mg/l (好ましくは 約 1.0 mg/l)
抗ヒトCD2 凝集粒子 (ビオチン標識されたマウス抗ヒトCD2クローンd118.10.1の飽和用量で標識された、アビジンでコーティングされた直径4.3ミクロンの常磁性ポリスチレン粒子)	0.1-30.0 x 10 ⁹ 粒子/l (好ましくは 約 3.0 x 10 ¹⁰ 粒子/l)
抗ヒトCD16 凝集粒子 (ビオチン標識されたマウス抗ヒトCD16クローン 3G8 の飽和用量で標識された、アビジンでコーティングされた直径4.3ミクロンの常磁性ポリスチレン粒子)	5.5 x 10 ¹¹ 粒子/l

10

20

【 0 0 7 6 】

(他の実施形態)

本発明は、先に記載した説明および実施例と組み合わせて記載されているものの、先の記載および実施例は、添付の特許請求の範囲において規定される、本発明の範囲を例示することが意図され、これを限定することは意図されない。他の局面、利点および改変は、この特許請求の範囲の範囲内である。

フロントページの続き

(72)発明者 デビット エム． シャウト

アメリカ合衆国 ミネソタ 5 5 1 2 5 , ウッドバレイ , ウィンターベリー コート 8 5 8

(72)発明者 ジェエル エイチ． ハブク

アメリカ合衆国 ミネソタ 5 5 4 3 0 , 5 5 ティーエイチ アベニュー ノース ブルックリ
ン センター 2 4 0 1

Fターム(参考) 4B065 AA90X BD14 BD39 CA44

专利名称(译)	细胞分离组合物和方法		
公开(公告)号	JP2008289506A	公开(公告)日	2008-12-04
申请号	JP2008232682	申请日	2008-09-10
[标]申请(专利权)人(译)	BIOE		
申请(专利权)人(译)	Baioi公司		
[标]发明人	ダニエルピーコリンズ デビットエムシャウト ジェエルエイチハプク		
发明人	ダニエル ピー. コリンズ デビット エム. シャウト ジェエル エイチ. ハプク		
IPC分类号	C12N1/02 A61K31/721 A61K31/727 B01D21/26 C12N5/00 G01N33/53 G01N33/537 G01N33/541 G01N33/543 G01N33/567 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/537 C07K16/2896 C12N5/0087 G01N33/5094 G01N33/541 G01N33/566 G01N33/56966 Y10T436/101666 Y10T436/107497 Y10T436/25375		
FI分类号	C12N1/02		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/BD14 4B065/BD39 4B065/CA44		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/282823 2001-04-10 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于细胞分离的组合物和方法，可用于组织培养，免疫表型测定，其他诊断测试，进一步纯化和有效制备用于治疗性给药的细胞。溶液：组合物包含 (a) 葡聚糖，(b) 抗血型糖蛋白A抗体，(c) 抗CD15抗体，(d) 抗CD9抗体，和 (e) 选自抗CD3的抗体提供了抗体，抗CD72抗体，抗CD16抗体，抗CD4抗体，抗CD8抗体和抗CD2抗体。Ž

表 3

デキストラン (平均分子量 413,000)	20 g/l
ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水 (10X)	100 ml/l
ヘパリンナトリウム (10,000 単位 /ml)	1 ml/l
ハンクス 平衡化塩溶液 (pH 7.2-7.4)	50 ml/l
抗ヒトグリコホリンA (マウス IgM モノクローナル抗体, クローン E4)	1.0 mg/l
抗ヒトCD2 常磁性凝集粒子 (ビオチン標識されたマウス抗ヒトCD2クローンd118.10.1の飽和用量で標識された、アビジンでコーティングされた直径4.3ミクロンの常磁性ポリスチレン粒子)	14.02 x 10 ⁹ 粒子/l